

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑪ DE 3707111 A1

⑳ Aktenzeichen: P 37 07 111.4  
㉔ Anmeldetag: 5. 3. 87  
㉕ Offenlegungstag: 22. 9. 88

㉙ Int. Cl. 4:  
C12N 15/00

A 01 H 1/06  
A 01 H 13/00  
C 12 N 1/16  
A 01 H 5/00  
C 12 N 5/00  
B 23 K 26/00

Netherlands Patent Office  
Library tel. 070 - 986655  
fax 070 - 900190 Rijswijk

㉙ Anmelder:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der  
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

㉚ Vertreter:

Wuesthoff, F., Dr.-Ing.; Frhr. von Pechmann, E.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Behrens, D., Dr.-Ing.; Goetz,  
R., Dipl.-Ing. Dipl.-Wirtsch.-Ing.; Hellfeld von, A.,  
Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 8000 München

㉛ Erfinder:

Weber, Gerd, Dr., 6802 Ladenburg, DE; Greulich,  
Karl Otto, Dr., 6900 Heidelberg, DE; Wolfrum,  
Jürgen, Dr., 3405 Rosdard, DE; Monajembashi,  
Shamci, 6900 Heidelberg, DE

2 DEC. 1988

㉜ Verfahren zum Einbringen von Genmaterial in Organellen, insbesondere Chloroplasten

In Pufferlösung suspendierte Organellen, insbesondere Chloroplasten, werden in einer feinen Glaskapillare aufgenommen, durch fokussierte Laserstrahlen mit Wellenbereich von 280 bis 340 nm und Wirkungsdurchmesser von 100 bis 300 nm so behandelt, daß in der Membranhülle eine punktförmige Öffnung kurzzeitig entsteht, durch die in der Pufferlösung enthaltenes fremdes Genmaterial in die Organelle eindiffundieren kann. Die Organellen werden dann in isolierte Protoplasten oder Pflanzenzellen implantiert und diese vermehrt und zu neuen Pflanzen entwickelt.

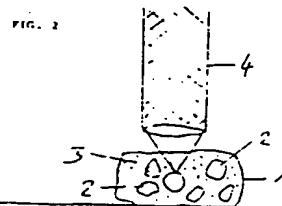
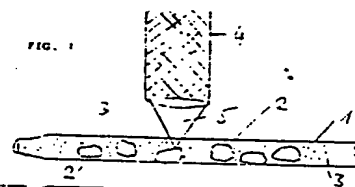


FIG. 1



DE 3707111 A1

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Einbringen von Genmaterial in isolierte Organellen, dadurch gekennzeichnet, daß man isolierte Organellen in einer Pufferlösung, die das Genmaterial gelöst enthält, suspendiert, die Suspension in eine Glaskapillare überführt und die Organellen einem fokussierten UV-Laserstrahl mit 280–340 nm Wellenlänge, dessen Fokus sich innerhalb der Glaskapillare befindet, aussetzt, wobei Laserpulse bei Sichtkontrolle unter dem Mikroskop ausgelöst werden, sobald jeweils eine Organelle sich mit der Oberfläche seiner Membranhülle an der Stelle des Fokus des Laserstrahls befindet, worauf die auf diese Weise ca. 10 Sekunden lang mit einer punktförmigen Öffnung in der Membranhülle versehenen Organellen nach dem Schließen der Öffnung isoliert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organellen Chloroplasten verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Genmaterial DNS anderer Organismen verwendet und in die Chloroplasten einbringt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man eine DNS verwendet, die herbizid-resistente Proteine codiert.

5. Anwendung des Verfahrens nach Anspruch 1 bis 4 zum Gentransfer bei der Herstellung neuer Pflanzensorten mittels Zell- und Gewebekulturen, dadurch gekennzeichnet, daß man die behandelten Chloroplasten in isolierte Protoplasten oder Pflanzenzellen implantiert, diese isoliert und vermehrt und daraus in an sich bekannter Weise eine neue Pflanze entwickelt.

6. Verfahren zum Einbringen von Genmaterial in Organellen, wie Chloroplasten von Pflanzenzellen, dadurch gekennzeichnet, daß man in die innere Zellflüssigkeit isolierter Zellen fremdes Genmaterial injiziert, diese Zellen bei Sichtkontrolle unter dem Mikroskop mit fokussierten UV-Laserpulsen mit 280–340 nm Wellenlänge so bestrahlt, daß sich der Fokus im Inneren der Zelle an der Oberfläche eines darin enthaltenen Chloroplasten befindet und eine punktförmige Öffnung der Membranhülle bewirkt, worauf die Zellen isoliert und vermehrt und zur Entwicklung neuer Pflanzen verwendet werden.

7. Abwandlung des Verfahrens nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß anstelle von Pflanzenzellen Hefezellen verwendet werden, in die fremdes Genmaterial injiziert wird, worauf bei den Mitochondrien im Innern der Zelle durch die fokussierten Laserpulse punktförmige Öffnungen in der Membranhülle erzeugt werden und dann die Hefezellen selektiert und vermehrt werden.

## Beschreibung

Es ist bereits seit längerem bekannt, durch die mikrochirurgische Methode mittels fokussierter Laserstrahlen unter dem Mikroskop eukariotische Zellen zu verändern und zu behandeln. So konnten durch die Laserstrahlen in pflanzlichen Zellen Chloroplasten oder Teile von Chloroplasten selektiv zerstört und bei Drosophila-zeilen auch bestimmte Bereiche der Chromosomen gespalten oder zerstört werden, um auf diese Weise gewis-

se Änderungen der Zellstrukturen in den suspendierten Zellen zu erreichen; vgl. M. W. Berns et al in SCIENCE, Bd. 213, S. 505–513 (1981). Auch hat man bei den in Pufferlösungen suspendierten Zellen, z. B. bei solchen von Nierenzellkulturen, unter dem Mikroskop die Zellwand mittels Laserstrahlen so perforiert, daß dann Genmaterial aus dem Suspensionsmedium, d. h. darin gelöste Desoxyribonucleinsäuren (DNS) anderer Organismen, in die Zellen eindiffundieren konnte, um so eine genmodifizierte Zelle zu erhalten. Bei diesen Versuchen wurde ein UV-Laserstrahl mit 355 nm Wellenlänge verwendet und unter Sichtkontrolle der Laserstrahl etwa 10 ns lang auf die Zellwand zur Einwirkung gebracht. Durch die hierbei erzeugte Öffnung mit Durchmesser im Mikrometerbereich von 1–5 µm in der Zellmembran konnte dann aus dem Zellsuspensionsmedium die darin gelöste DNS eindringen; vgl. M. Tsukakoshi et al in Appl. Phys. B 35, S. 135–140 (1984) sowie Shunichi Kurata et al in Exp Cell Res 162 (1986) 372–378 und Cell Structure and Function 11, 205–207 (1986) sowie EP-A 01 37 504.

Versuche in gleicher Weise mit diesen Laserstrahlen auch isolierte Organellen, wie Chloroplasten der pflanzlichen Zellen, die in gleicher Weise in einem Suspensionsmedium aufgeschlämmt waren, unter dem Mikroskop zu öffnen und so genetisch zu verändern, führen nicht zum Erfolg. Die Chloroplasten wurden wie schon bei den eingangs erwähnten, vorbeschriebenen Versuchen durch die mikrochirurgische Behandlungsmethode zerstört.

Es wurde nun überraschenderweise festgestellt, daß es dann gelingt, bei den isolierten Organellen, z. B. bei Chloroplasten von pflanzlichen Zellen, eine Öffnung der Membranhülle für einen derartigen Gentransfer zu erreichen, wenn man die isolierten und in einer Pufferlösung suspendierten Chloroplasten in einer feinen Glaskapillare, deren innerer Durchmesser etwa dem 1,5- bis 3fachen Durchmesser der betreffenden Organellen entspricht und vorzugsweise 15–20 µm lichte Weite aufweist, einem fokussierten Laserpuls mit Wellenlänge im Bereich von 280 bis 340 nm und einem Wirkungsdurchmesser von 100 bis 300 nm aussetzt. Dadurch, daß der Strahl so gesteuert wird, daß die maximale Fokussierung des Strahls erst hinter der Glaskapillarwandung an der Oberfläche des manipulierten Chloroplasten erfolgt, wird dort kurzzeitig eine sehr feine kleine Öffnung im Nanometerbereich in der Chloroplastenmembran erreicht, ohne daß der Chloroplast hierbei dauernd geschädigt wird. Diese kleine, wenige 100 nm große Öffnung schließt sich nach etwa 10 Sekunden wieder selbstständig.

Diese Zeitspanne reicht aus, um zu erreichen, daß etwas von dem in der Pufferlösung enthaltenen Genmaterial in die Chloroplasten einwandern kann.

Durch eine unterschiedliche osmotische Konzentration der Pufferlösung kann das Eindringen des Genmaterials in die mit dem Laserstrahl geöffneten Chloroplasten gefördert werden. Von Vorteil ist es, wenn man Chloroplasten in der Glaskapillare behandelt, die vorher durch kurzzeitiges einbringen in eine Pufferlösung mit erhöhtem osmotischen Druck gegenüber der inneren Chloroplastenflüssigkeit, d. h. mit höherer Osmolarität, etwas geschrumpft sind. Die geschrumpften isolierten Chloroplasten werden dann in einer Pufferlösung mit demselben osmotischen Druck, die dann auch die betreffende einzuschleusende DNS enthält, suspendiert, worauf diese Suspension in die Glaskapillare aufgenommen und dort dem Laserstrahl ausgesetzt wird. Auf die-

se Weise wird erreicht, daß in der kurzen Zeit der Öffnung der Membran der Chloroplasten eine größere Menge an Pufferflüssigkeit mit der DNS einströmt, bevor sich die Öffnung in der Membran wieder selbständig schließt.

Die so erstmals durch eine nanochirurgische Behandlung erfindungsgemäß mit zusätzlichen Genen versehenen Chloroplasten werden schließlich von dem Suspensionsmedium abgetrennt, erneut in Pufferlösung suspendiert und in an sich bekannter Weise unter dem Mikroskop in isolierte Protoplasten oder Zellen transplantiert und vermehrt. Die in der Glaskapillare mit dem Laserstrahl behandelten Chloroplasten können gegebenenfalls auch unmittelbar aus der feinen Glaskapillare in die betreffenden isolierten Pflanzenzellen implantiert werden, indem man die Glaskapillare, die vorzugsweise an ihrem einen Ende verjüngt ist, gleich als Injektionsnadel für das Injizieren der Chloroplasten in den Protoplast oder die Zelle verwendet.

Pflanzliche Zellen mit der zusätzlichen genetischen Information in den Chloroplasten werden selektioniert und können durch die bekannten Methoden der Zellvermehrung und -gewebekulturen, Kallusbildung usw. zur Regeneration von Pflanzen mit zusätzlichen, d. h. fremden Genen im Genom verwendet werden. Auf diese Weise können z. B. herbizidresistente Pflanzen gezüchtet werden, wenn man klonierte Gene, die die Bildung von solchen Enzymen codieren, die gegen bestimmte Herbizide resistent sind, in die Chloroplasten einschleust, die in die Zellen für die Zellkultur der betreffenden Pflanzen implantiert werden.

Die Fig. 1 zeigt schematisch die erfindungsgemäße nanochirurgische Behandlung der Organellen, d. h. der Chloroplasten. In einer Glaskapillare (1) befinden sich isolierte Chloroplasten (2) in einem Suspensionsmedium, in dem die zu implantierende DNS (3) gelöst ist. Die Laservorrichtung für Strahlen mit 280–340 nm wird mit ihrem Strahlerkopf (4) in einem solchen Abstand über der Glaskapillare angeordnet, daß der Fokus des Laserstrahls (5) sich etwa in der Mitte der Kapillare befindet. Unter dem Mikroskop wird nun langsam die Chloroplastensuspension durch die Kapillare unter Sichtkontrolle durch das Mikroskop bewegt. Dann, wenn einer der Chloroplasten sich im Bereich des Fokuspunktes befindet, wird der Laserpuls ausgelöst. Durch die so erzeugte punktförmige Öffnung von 100–300 nm Durchmesser tritt das Suspensionsmedium mit darin gelöster DNS (3) in den Chloroplast ein, dessen Membranhülle sich nach kurzer Zeit wieder selbständig schließt. Auf diese Weise werden nacheinander die in der Kapillare aufgesaugten isolierten Chloroplasten behandelt. Sie können dann in Protoplasten, Algenzellen oder höhere pflanzliche Zellen implantiert und dort vermehrt werden.

In weiterer Ausbildung der Erfindung wurde auch erkannt, daß man mit Hilfe des fokussierten Laserstrahls der beanspruchten Wellenlänge und Energie auch die Chloroplasten unter dem Mikroskop innerhalb einer Algen- oder Pflanzenzelle unmittelbar erfindungsgemäß behandeln kann, wenn man die in die Chloroplasten einzubringende DNS zuvor in die Zellflüssigkeit injiziert hat und dann den Laserpuls so einrichtet, daß der Laserstrahl durch die Zellmembran dringend erst an der Chloroplastenoberfläche punktförmig fokussiert ist. Hierbei wird die Zellmembran selbst überraschenderweise nicht geschädigt, da der Laserstrahl beim Durchtritt durch die Zellmembran noch nicht maximal fokussiert ist, was erst innerhalb der Zelle an der Oberfläche

des jeweils zu behandelnden Chloroplasts, der Fall ist, wo die dort gebündelte Energie zur Öffnung der Chloroplastenmembran führt. Beim Durchtritt durch die Zellmembran ist die Energie noch auf eine so große Flächeneinheit verteilt, daß dort keine Schädigung und Perforierung bzw. Öffnung der Zellhülle eintritt. Erst innerhalb der Zelle ist der Strahl so fokussiert, daß beim Auftreffen auf die Chloroplastenmembran die Energie zur punktförmigen Öffnung ausreicht. Auch hierbei tritt dann Zellflüssigkeit mit der darin suspendierten DNS in den Chloroplasten ein, worauf sich nach ca. 10 Sekunden diese Öffnung wieder schließt. Die schematische Zeichnung der Fig. 2 zeigt diese Ausführungsform der erfindungsgemäßen Behandlung der Organellen in situ, d. h. innerhalb der betreffenden Zelle (1), in deren Zellflüssigkeit sich die Chloroplasten (2) und die injizierte DNS (3) befindet. Der Strahl des Lasers (4) ist so gesteuert, daß sein Fokus im Inneren der Zelle liegt.

Das neue nanochirurgische Verfahren mittels fokussierter Laserstrahlen des beanspruchten Wellenbereichs läßt sich bei den verschiedensten Organellen anwenden. Außer den Chloroplasten von Algen und höheren Pflanzen können auch die Membranhüllen oder Organellen von Hefezellen ohne bleibende Schädigung punktförmig und kurzzeitig geöffnet werden, so daß Genmaterial, das dem Suspensionsmedium oder der Innenflüssigkeit der Hefezellen zugefügt wurde, in die Mitochondrien eindringt. Das neue nano-chirurgische Verfahren zur Gentransplantation über die Organellen der Zellen ist daher vielseitig anwendbar.

Zum Nachweis, daß bei dieser erfindungsgemäßen Manipulation in der Glaskapillare tatsächlich die im Suspensionsmedium enthaltene DNS in der kurzen Zeit durch die punktförmige Öffnung in den Chloroplast eingedrungen ist, wurde eine durch eine fluoreszierende Gruppe substituierte, d. h. markierte DNS verwendet, die in dem Suspensionsmedium für die zu bestrahlenden isolierten Chloroplasten gelöst wurde. Nach der Behandlung mit dem Laserstrahl wurden die Chloroplasten aus der Glaskapillare in ein Medium überführt, welches Desoxyribonuclease enthielt. Nach Ablauf der zur Spaltung der DNS notwendigen Inkubationsdauer war die gesamte markierte freie DNS in der Lösung abgebaut, nicht dagegen die in die Chloroplasten implantierte DNS, was durch Fluoreszenz der Chloroplasten im UV-Licht unter dem Mikroskop erkennbar war.

Dieser Befund zeigt, daß während der kurzen Öffnungszeit genügend DNS in die Chloroplasten eingedrungen war und sich die mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens erzeugte Öffnung in der Chloroplastenmembran nach kurzer Zeit wieder selbständig verschlossen hat. Der eingedrungene DNS-Anteil war gegen die Behandlung mit dem Enzym geschützt und machte diese Chloroplasten dann fluoreszierend.

Die Fig. 3 zeigt eine mikroskopische Aufnahme der isolierten, durch die erfindungsgemäße Behandlung mit Fluoreszenz-markierter DNS versehenen Chloroplasten nach Inkubation mit dem DNS abbauenden Enzym.

Das nachfolgende Beispiel dient zur näheren Erläuterung der Erfindung anhand von Chloroplasten, die aus Zellen des Raps (*Brassica napus* L.) erhalten wurden:

#### Beispiel

1. Gewinnung von Protoplasten aus Hypokotylen. Hypokotyle steril gekeimter Rapsplänzchen werden in folgender Enzymlösung zu Protoplasten verdaut. Die Protoplasten dienen als Rezipienten für

Chloroplasten.  
Zusammensetzung:

Cellulase "Onozuka R10"	0,5%
Pectinase "Macerozyme R10"	0,1%
Mannit	0,385 M

Kulturmedium (Glimelius 1984)

pH 5,7, Gesamtosmolarität 0,525 osmol  $\times$  kg<sup>-1</sup>

2. Herstellung von Protoplasten aus Mesophyll.

Sterile Blättchen werden in der Enzymlösung (siehe 1) verdaut.

3. Waschen der Protoplasten

Protoplasten werden nach Beendigung der Enzymverdauung drei mal durch Zentrifugation gewaschen (100  $\times$  g; 5 min) Zusammensetzung des Waschpuffers:

Kaliumchlorid	252 mM
Ammoniumnitrat	2 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1 mM
Calciumchlorid	3 mM
Saccharose	50 mM

pH 5,6, Gesamtosmolarität 0,525 osmol  $\times$  kg<sup>-1</sup>

4. Die Hypokotylprotoplasten (Rezipienten) werden in Kulturmedium resuspendiert, das 2% Agarose enthält und anschließend auf Deckgläsern ausplattiert. Das Kulturmedium ist beschrieben von Glimelius in Physiol. Plant 61, 38–44 (1984).

Isolation von Chloroplasten aus Mesophyllprotoplasten

5. Herstellung von Chloroplasten aus Protoplasten.

Die Protoplasten werden nach dem letzten Waschschritt in Chloroplastenpuffer (Zusammensetzung siehe unten) aufgenommen. Mit einer Spritze und einer Kanüle werden die Protoplasten aufgebrochen. Die großen Zellbestandteile werden von den Chloroplasten durch Zentrifugation bei 50  $\times$  g (5 min) getrennt. Anschließend werden die Chloroplasten bei 1000  $\times$  g für 2 min sedimentiert. Die Chloroplasten werden in Puffer resuspendiert.

Zusammensetzung des Chloroplastenpuffers:

Sorbitol	0,55 M
Natriumchlorid	83 mM
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	16,67 mM
Cystein	4,7 mM
EDTA	3,3 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	0,83 mM
Magnesiumchlorid	1,67 mM
Manganchlorid	1,67 mM

pH 6,1

Laserbestrahlung zur Öffnung von Chloroplasten

6. Die Chloroplasten werden in selbstgezogenen Glaskapillaren aufgenommen. Die Kapillaren haben einen Innendurchmesser zwischen 15–25  $\mu$ m. Die Öffnung an der Spitze der Kapillare hat einen Durchmesser von 10–20  $\mu$ m.

7. Die Chloroplasten sind in einem DNS-haltigen Puffer suspendiert.

Plasmid: pBR322; E. coli  
Konzentration: 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l

Die DNS ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisben-

zimid (Hoechst 33258) markiert.

8. Die Laserbestrahlung erfolgte in einem Mikroskop (Zeiss IM35).

Als Laser werden in Excimer Laser EMG 103MSC und ein Farbstofflaser FL 2002 der Firma Lambda Physik verwendet. Der Laserstrahl wird durch ein Objektiv Ultrafluor 100 (Zeiss) fokussiert.

Wellenlänge:	340 nm
Pulsdauer:	15 nsec.
Energie:	1–10 $\mu$ J
Strahlqualität:	TEM <sub>00</sub>

Die Zeit nach dem Laserpuls, in der die Chloroplastenmembran geöffnet ist, beträgt weniger als 10 sec. Während dieser Zeitspanne ist markierte DNS in das Innere der Chloroplasten eingedrungen. Nach Zugabe von Desoxyribonuclease zum Suspensionsmedium wird die Fluoreszenz der aufgenommenen DNS durch eine Videokamera und ein Bildverarbeitungssystem (Hamamatsu Image Processor C1966) beobachtet. Die Fig. 3 zeigt das hierbei erhaltene Bild. Die Beständigkeit der Fluoreszenz der markierten DNS in den Chloroplasten läßt erkennen, daß die Chloroplastenmembran sich nach Laserbehandlung und DNS-Aufnahme wieder selbständig geschlossen hat, da dieser Anteil der DNS gegen den fermentativen Abbau geschützt war.

- Leerseite -

Nummer:

37 07 111

Int. Cl. 4:

C 12 N 15/00

Anmeldetag:

5. März 1987

Offenlegungstag:

22. September 1988

3707111

1/1

FIG. 1

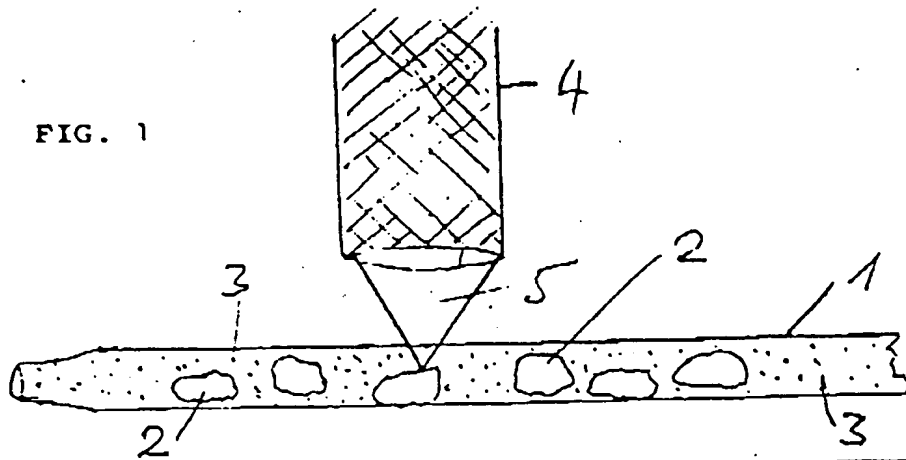


FIG. 2

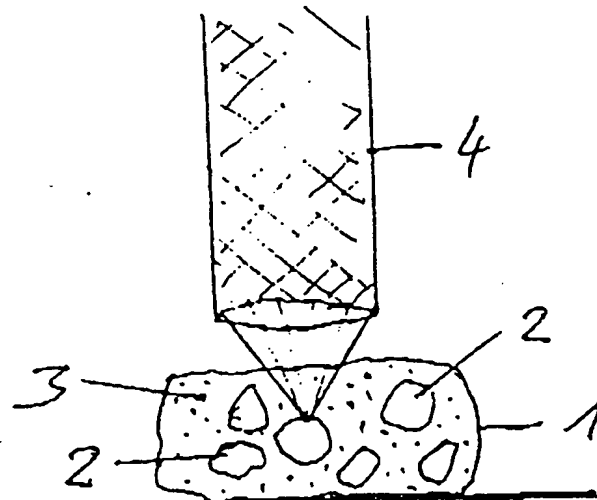


FIG. 3

